

09 / 4466346  
PCT/JP98/02785

17.07.98

日本特許庁  
PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D	31 JUL 1998
WIPO	PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application: 1997年 6月27日

出願番号  
Application Number: 平成 9年特許願第171440号

出願人  
Applicant(s): 小野薬品工業株式会社

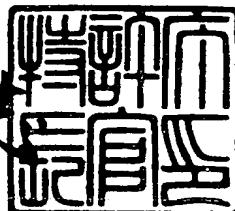
PRIORITY  
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1998年 7月 3日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

伴佐山 建志



出証番号 出証特平10-3053004

【書類名】 特許願  
【整理番号】 ONP2352  
【提出日】 平成 9年 6月27日  
【あて先】 特許庁長官 荒井 寿光 殿  
【国際特許分類】 C12N 15/00  
C07K 14/705  
C07K 16/28  
C12Q 1/00  
【発明の名称】 新規なレポーター遺伝子DNAを含むプラスミドDNA  
およびそのプラスミドDNAを用いた細胞核内受容体の  
リガンドの検出方法  
【請求項の数】 23  
【発明者】  
【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町桜井3-1-1 小野薬品工業株式  
会社 水無瀬総合研究所内  
【氏名】 萩谷 洋  
【発明者】  
【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町桜井3-1-1 小野薬品工業株式  
会社 水無瀬総合研究所内  
【氏名】 南 真志  
【発明者】  
【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町桜井3-1-1 小野薬品工業株式  
会社 水無瀬総合研究所内  
【氏名】 田嶋 久男  
【特許出願人】  
【識別番号】 000185983  
【郵便番号】 541  
【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区道修町2丁目1番5号  
【氏名又は名称】 小野薬品工業株式会社

【代表者】 上野 利雄

【代理人】

【識別番号】 100081086

【郵便番号】 103

【住所又は居所】 東京都中央区日本橋人形町2丁目2番6号 堀口第2ビル7階 大家特許事務所

【弁理士】

【氏名又は名称】 大家 邦久

【電話番号】 03(3669)7714

【代理人】

【識別番号】 100088719

【郵便番号】 103

【住所又は居所】 東京都中央区日本橋人形町2丁目2番6号 堀口第2ビル7階 大家特許事務所

【弁理士】

【氏名又は名称】 千葉 博史

【電話番号】 03(3669)7714

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 043731

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規なレポーター遺伝子DNAを含むプラスミドDNAおよびそのプラスミドDNAを用いた細胞核内受容体のリガンドの検出方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 Gα14蛋白の応答配列の下流に、プロモーター、さらにFαs抗原の膜貫通領域と機能発現領域を含むアミノ酸配列をコードするDNAを含むプラスミドDNA。

【請求項2】 Fαs抗原の膜貫通領域と機能発現領域を含むアミノ酸配列が、マウスFαs抗原の136番目から305番目までのアミノ酸配列であるか、またはヒトFαs抗原の145番目から319番目までのアミノ酸配列である請求項1記載のプラスミドDNA。

【請求項3】 Fαs抗原の膜貫通領域と機能発現領域を含むアミノ酸配列のN末端に、Fαs抗原のシグナルペプチド領域を含むアミノ酸配列を結合させた請求項1または2記載のプラスミドDNA。

【請求項4】 Fαs抗原のシグナルペプチド領域を含むアミノ酸配列が、マウスFαs抗原の-21番目から14番目までのアミノ酸配列であるか、またはヒトFαs抗原の-16番目から23番目までのアミノ酸配列である請求項3記載のプラスミドDNA。

【請求項5】 請求項1記載のプラスミドDNAとエフェクター蛋白をコードするDNAの両DNAで形質転換された形質転換体。

【請求項6】 エフェクター蛋白がGα14蛋白のDNA結合領域を含むアミノ酸配列のC端末に、細胞核内受容体のリガンド結合領域を含むアミノ酸配列を結合させた融合蛋白である請求項5記載の形質転換体。

【請求項7】 細胞核内受容体がステロイド受容体である請求項6記載の形質転換体。

【請求項8】 細胞核内受容体がPPAR $\alpha$ 受容体である請求項6記載の形質転換体。

【請求項9】 細胞核内受容体のリガンド結合領域を含むアミノ酸配列がヒトPPAR $\alpha$ 受容体の178番目から467番目までのアミノ酸配列、またはマ

ウスPPAR $\alpha$ 受容体の167番目から468番目までである請求項8記載の形質転換体。

【請求項10】 細胞核内受容体がPPAR $\delta$ 受容体である請求項6記載の形質転換体。

【請求項11】 細胞核内受容体のリガンド結合領域を含むアミノ酸配列がヒトPPAR $\delta$ 受容体の139番目から441番目までのアミノ酸配列、またはマウスPPAR $\delta$ 受容体の138番目から440番目までである請求項10記載の形質転換体。

【請求項12】 細胞核内受容体がPPAR $\gamma$ 受容体である請求項6記載の形質転換体。

【請求項13】 細胞核内受容体のリガンド結合領域を含むアミノ酸配列がヒトPPAR $\gamma 1$ 受容体の176番目から478番目までのアミノ酸配列、マウスPPAR $\gamma 1$ 受容体の174番目から475番目までのアミノ酸配列、ヒトPPAR $\gamma 2$ 受容体の204番目から506番目までのアミノ酸配列、またはマウスPPAR $\gamma 2$ 受容体の204番目から505番目までである請求項12記載の形質転換体。

【請求項14】 細胞核内受容体がレチノイドX受容体である請求項6記載の形質転換体。

【請求項15】 細胞核内受容体のリガンド結合領域を含むアミノ酸配列が、ヒトレチノイドX受容体 $\alpha$ の225番目から462番目までのアミノ酸配列、ヒトレチノイドX受容体 $\beta$ の297番目から526番目までのアミノ酸配列、マウスレチノイドX受容体 $\alpha$ の230番目から467番目までのアミノ酸配列、マウスレチノイドX受容体 $\beta$ の171番目から410番目までのアミノ酸配列、またはマウスレチノイドX受容体 $\gamma$ の229番目から463番目までのアミノ酸配列である請求項14記載の形質転換体。

【請求項16】 細胞核内受容体がレチノイン酸受容体である請求項6記載の形質転換体。

【請求項17】 細胞核内受容体のリガンド結合領域を含むアミノ酸配列が、ヒトレチノイン酸受容体 $\alpha$ の198番目から462番目までのアミノ酸配列、

ヒトレチノイン酸受容体 $\beta$ の191番目から448番目までのアミノ酸配列、ヒトレチノイン酸受容体 $\gamma$ の200番目から454番目までのアミノ酸配列、マウスレチノイン酸受容体 $\alpha$ の198番目から462番目までのアミノ酸配列、マウスレチノイン酸受容体 $\beta$ の190番目から448番目までのアミノ酸配列、またはマウスレチノイン酸受容体 $\gamma$ の200番目から458番目までのアミノ酸配列である請求項16記載の形質転換体。

【請求項18】 細胞核内受容体がビタミンD3受容体である請求項6記載の形質転換体。

【請求項19】 細胞核内受容体が甲状腺ホルモン受容体である請求項6記載の形質転換体。

【請求項20】 請求項1乃至4のいずれかに記載のプラスミドDNAとエフェクター蛋白をコードするDNAを有効成分として含有するガンまたは自己免疫疾患の治療剤。

【請求項21】 請求項5乃至19のいずれかに記載された形質転換体を形質転換するためのDNAを有効成分として含有するガンまたは自己免疫疾患の治療剤。

【請求項22】 請求項5乃至19のいずれかに記載された形質転換体を用いることを特徴とする細胞核内受容体に対するアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング方法。

【請求項23】 請求項5乃至19のいずれかに記載された形質転換体が、マウス纖維芽細胞L929またはヒトガン細胞HeLaであることを特徴とする、PPAR $\alpha$ 受容体またはPPAR $\gamma$ 受容体に対するアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング方法。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【0001】

##### 【発明の属する技術分野】

本発明は、(i)新規なレポーター遺伝子DNAを含むプラスミドDNA、(ii)前記プラスミドDNAと公知のエフェクター蛋白をコードするDNAで形質転換された形質転換体、(iii)前記両DNAを有効成分として含有するガンま

たは自己免疫疾患の治療剤、および(iv)前記形質転換体を用いる細胞核内受容体のリガンドの検出方法に関する。

さらに詳しくは、(i)新規なレポーター遺伝子、すなわち酵母の基本転写因子であるGα14蛋白の応答配列（以下、UASと略記する。）を複数回繰り返したエンハンサー要素下流に、必要最小限のプロモーター、さらに遺伝子発現効果を検出するためにFas抗原の膜貫通領域と機能発現領域を含むアミノ酸配列をコードするDNAを含むプラスミドDNA、(ii)前記プラスミドDNAと公知のエフェクター蛋白、すなわちGα14蛋白のDNA結合領域を含むアミノ酸配列のC端末に、細胞核内受容体のリガンド結合領域を含むアミノ酸配列を結合させた融合蛋白をコードするDNAの2つで形質転換された形質転換体、(iii)前記両DNAを有効成分として含有するガンまたは自己免疫疾患の治療剤、および(iv)前記形質転換体を用いる細胞核内受容体のリガンドの検出方法に関する。

#### 【0002】

##### 【発明の背景】

最近、サイトカインやホルモンに代表される、重要な生理活性を有する液性因子の受容体が遺伝子操作によって解明され、多くの受容体が単離、同定されてきた。それらの中には、例えば、細胞核内受容体と総称される脂溶性ホルモンの受容体がある。種々の細胞核内受容体のアミノ酸配列を解析した結果、それらは共通の基本構造を有するリガンド依存性の転写因子であり、ひとつの遺伝子ファミリーを形成することが明らかとなった。すなわち、グルココルチコイド受容体、プロゲステロン受容体、ミネラルコルチコイド受容体、アンドロジエン受容体、エストロジエン受容体などのステロイド受容体、レチノイドX受容体、レチノイン酸受容体等のレチノイド受容体、さらにペルオキシソーム増殖葉活性化受容体、ビタミンD<sub>3</sub>受容体や甲状腺ホルモン受容体からなるファミリーである。これらの受容体については、リガンド結合部位、標的DNAの配列を認識する部位などの機能領域が明確に分離していることがわかっており [Science, 240, 889(1988)参照]、その相同性から単離はされたが、リガンドが依然として不明である受容体も存在する。

## 【0003】

最近、脂肪細胞分化マーカー遺伝子の発現誘導にかかる転写因子の研究において、核内受容体であるペルオキシソーム増殖葉活性化受容体（以下、PPAR受容体と略記する。）が注目されている。PPAR受容体は、さまざまな動物種からcDNAがクローニングされ、複数のアイソフォーム遺伝子が見出され、哺乳類では $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\gamma$ の3種類が知られている。さらに、 $\gamma$ 型は脂肪組織、免疫細胞、副腎、脾臓、小腸で、 $\alpha$ 型は肝臓、網膜で発現し、 $\delta$ 型は組織特異性が見られず普遍的に発現していることも知られている。

## 【0004】

一方、Fas抗原は、プログラムされた細胞死（アポトーシス）に関与することが明確に示された膜蛋白である。ヨネハラ（Yonehara）等は、ヒト細胞表面抗原に対するモノクローナル抗体を作製し、種々のヒト細胞に対し致死活性を示す抗Fas抗体を得た [J. Exp. Med., 169, 1747(1989)参照]。抗Fas抗体の認識する細胞表面分子のcDNAが単離され、ヒトFas抗原の構造が決定された [Cell, 66, 233(1991)参照]。Fas抗原は335個のアミノ酸からなり、N末端側16個のアミノ酸はシグナルペプチドと推定されている。分子の中央には疎水性アミノ酸17個よりなる膜貫通領域が存在し、N末端側157個のアミノ酸が細胞外領域、C末端側145個のアミノ酸が細胞質領域と考えられる。

## 【0005】

Fas抗原の構造は、ガン壞死因子（TNF）の受容体と類似しているため、Fas抗体によるアポトーシスはTNFの作用と類似したメカニズムで起こるものと推定されている。Fas抗原の機能領域も次第に明らかにされ、アポトーシスのシグナル伝達に必須の領域（機能発現領域）は175番目から304番目までのアミノ酸配列部分であることがわかっている [J. Biol. Chem., 268, 10932 (1993)参照]。さらに、マウスのFas抗原についても、そのアミノ酸配列が明らかになっており [J. Immunology, 148, 1274(1992)参照]、ヒトのFas抗原に対して全体として49.3%のホモロジーを有している。また機能発現領域は、ヒトFas抗原の該領域に相当する、166番目から291番目までのアミノ酸配列であると考えられている。

## 【0006】

## 【従来の技術およびその課題】

受容体はリガンド結合領域とシグナル伝達領域を有している。リガンド結合領域にリガンドが結合すると、シグナル伝達領域の立体構造が変化し、シグナルが別の蛋白やDNAに伝達される。

最近、ある受容体のリガンド結合領域と、異種の蛋白質のシグナル伝達領域とを結合した融合蛋白におけるシグナル伝達に関する研究が盛んに行なわれている。

例えば、ステロイド受容体のひとつであるエストロジエン受容体のリガンド（すなわち、エストロジエン）結合領域とヒトガン遺伝子c-Mycのシグナル伝達領域との融合蛋白をコードする遺伝子で形質転換された細胞は、エストロジエンの刺激によって細胞がガン化し、異常増殖することが判明した [Nature, 340, 66(1989)参照]。

## 【0007】

同様の実験が、グルココルチコイド、ミネラルコルチコイド、エストロジエンの各受容体のリガンド結合領域とE1A（アデノウイルス）、c-Fos、v-Myc、C/EBP、v-Rel、GATA-1, 2, 3、GAL4-VP16、Rev（HIV）、c-Ab1の各蛋白質の機能発現領域との融合蛋白において行なわれており [Cell, 54, 1073(1988)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 5114(1991)、EMBO J., 10, 3713(1991)、Science, 251, 288(1991)、EMBO J., 11, 4641(1992)、Genes Dev. (in press)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 1657(1993)、ibid., 87, 7787(1990)、EMBO J., 12, 2809(1993)参照]、いずれも核内受容体に対応するリガンドが結合されることによってシグナルが伝達されることが確認されている。

## 【0008】

垣塚らは、前記した融合蛋白をガン治療に応用する目的でシグナル伝達蛋白としてFas抗原を用いる方法を報告している（特開平7-316200号参照）。この方法は、機能発現領域だけでなく膜貫通領域も含めた136番目から305番目までのアミノ酸配列部分を、細胞核内受容体のリガンド結合領域と融合させるもの

である。その結果、核内受容体リガンド結合領域のアミノ酸配列に相互作用するリガンドが有効に検出できる。

## 【0009】

一方、エヴァンス (R. M. Evans) らはGα14 応答配列下流に基質を化学発光または可視色素の産物に変換するか、または置換基を導入する酵素（例えば、ルシフェラーゼ、β-ガラクトシダーゼ、分泌型アルカリホスファターゼまたはクロラムフェニコールアセチル転移酵素等）を用いたレポーターと、Gα14 のDNA結合ドメインとPPAR受容体リガンド結合領域とを融合した蛋白を細胞内に導入するレポーターアッセイの方法を報告している（PCT国際出願国際公開9640128号参照）。また、外来性のPPAR受容体蛋白を発現させ、または内在性のPPAR受容体蛋白と、上記のレポーター、ただしこの場合はPPAR受容体応答配列（以下、PPREと略記する。）下流に上記の酵素を用いたレポーターを導入するアッセイの方法が報告されている（Cell, 83, 803(1995)参照）。これらのアッセイ系は、細胞核内受容体の転写因子としての機能を評価できる検出系である。

しかし、これらの方法は、活性検出に時間を要し、リガンドや被験化合物の効果を高速スクリーニングすることが困難である。かつ、細胞内にDNAを導入する際に一過性導入であるため実験間の安定性に難があり、比較しにくいという問題がある。

## 【0010】

## 【課題を解決する手段】

本発明者らは、細胞核内受容体のリガンドに結合する化合物を高速スクリーニングする目的で検討を重ねた結果、Fas蛋白を発現させるレポーターアッセイを用いることにより、目的を達成することを見出した。

すなわち、Fas構造蛋白の機能領域を用いたレポーターとGα14のDNA結合領域と核内受容体（特に、PPAR受容体）リガンド結合領域とを融合した蛋白をコードするDNAを含む発現ベクターをマウス繊維芽細胞L929細胞内に安定導入した。核内受容体のリガンド結合領域のアミノ酸配列にリガンドや化合物が結合しない状態では細胞が増殖するが、リガンドや化合物が結合した場合

は Fas 蛋白が発現誘導され、細胞死が生じた。この細胞死を起こした細胞を生存細胞と洗浄分離した後、生存細胞を色素染色し、その吸光度を測定することにより、細胞核内受容体のリガンド結合領域と相互作用し、かつ機能的に転写因子活性を上昇、あるいは減少させる化合物を高速でスクリーニングすることに成功した。

## 【0011】

## 【従来技術との比較】

本発明の高速スクリーニング方法は、これまでまったく知られていない新規な方法である。

本発明の方法は、レポーターとして Fas 構造蛋白機能領域を用い、Fas 蛋白を発現させ細胞死を起こさせて測定するものであって、レポーターとして化学発光（特に、ルシフェラーゼ）または可視色素を生む酵素（特に、β-ガラクトシダーゼ）を用い、酵素の発現量（酵素活性）を測定するエヴァンス（R. M. Evans）らの方法とは全く異なるものである。

## 【0012】

標準的な実験方法における比較においては、エヴァンス（R. M. Evans）らの方法では第1日目に細胞にDNAを導入し、血清刺激を行った後、必要に応じて再播種し、46～48時間後（第3日目）に被験化合物を加え、その24時間後（最終日）にルシフェラーゼ活性を測定する最短4日のスケジュールである。また、細胞内にDNAを導入する際の一過性導入では実験間の安定性や比較が問題になる。各測定を標準化するために別の酵素をコードするDNAを含む発現ベクターと共に導入する場合もあるが操作は繁雑になる。さらに、ルシフェラーゼを用いる方法は個々の値の振れが大きいため数多い例数が必要である（通常n数を3～4要す。）。あるいは同時に導入した内標遺伝子（β-ガラクトシターゼ等）で標準化する必要がある。

## 【0013】

一方、本発明では細胞が準備されていれば、第1日目に被験化合物を加え、翌日の後半（36時間後）には細胞を色素染色によって測定できる最短2日のスケジュールである。また、L929細胞（同一クローン）を使用するため実験間の

比較が容易である。さらに、Fas蛋白を用いる方法は個々の値の振れが小さいため数多い例数が必要とならない（通常n数を1～2要す。）。

【0014】

すなわち、本発明の方法によれば、細胞核内受容体の機能を変化させうるリガンドや化合物の高速評価が可能であり、操作自体が簡便である。また、個々の値の振れが小さく、実験間の比較ができ、非常に安定している。以上のこととは、特に多検体高速評価において威力を発揮する。さらに実際汎用されている自動測定器（ロボット）では必ず吸光度測定器が付属されているので、ロボット対応型の化合物評価系といえる。このことは先行技術からみて全く予期できないことであり、今回本発明者らが実験により初めて確認したことである。また、本発明の方法では酵素基質を必要としないため、大幅なコストダウンが図られる。

【0015】

【発明の開示】

本発明は、

- (i) 新規なレポーター遺伝子DNAを含むプラスミドDNA、
- (ii) 前記プラスミドDNAと公知のエフェクター蛋白をコードするDNAで形質転換された形質転換体、
- (iii) 前記両DNAを有効成分として含有するガンまたは自己免疫疾患の治療剤、および
- (iv) 前記形質転換体を用いる細胞核内受容体のリガンドの検出方法に関する。

【0016】

本発明においては、Fas抗原および細胞核内受容体は、哺乳動物由来のもの、例えば、ヒト、サル、イヌ、ネコ、マウス、ラット、モルモット由来のものが用いられる。Fas抗原および細胞核内受容体は、好ましくは互いに同じ種のものが用いられるが、異なった種のものを用いてもよい。本発明では互いに異なった種のものを用いてもシグナル伝達が行えることが確認されている。例えば、ヒトのFas抗原とヒトの細胞核内受容体の組合せ、マウスのFas抗原とヒトの細胞核内受容体の組合せ、ヒトのFas抗原とラットの細胞核内受容体の組合せ、マウスのFas抗原とラットの細胞核内受容体の組合せ、ヒトのFas抗原と

マウスの細胞核内受容体の組合せ、またはマウスのFas抗原とマウスの細胞核内受容体の組合せが好適に用いられる。

## 【0017】

本発明に用いられるFas抗原の膜貫通領域と機能発現領域を含むアミノ酸配列、および細胞核内受容体のリガンド結合領域を含むアミノ酸配列としては、各領域に相当する部分だけを用いてもよいが、それ以外に、各領域に相当する部分の両端（N末端および／またはC末端）に、フランкиング領域（機能領域に関与しない領域、アミノ酸配列にして数10個、好ましくは60個以下）を含んだものを用いてもよい。さらに、所望の場合には、Fas抗原の膜貫通領域のN末端には、シグナルペプチド領域を含むアミノ酸配列を結合していてもよい。各領域に相当するアミノ酸配列としては、天然のアミノ酸配列だけでなく、本来のFas抗原が有するアポトーシス機能または細胞核内受容体が有するリガンド結合機能を損なわない程度に、アミノ酸が欠損、置換、付加および／または挿入されたものを用いることができる。

## 【0018】

本発明で用いられるFas抗原のうち、ヒトFas抗原の膜貫通領域と機能発現領域を含むアミノ酸配列としては、145番目のSerから319番目のValがあり、マウスFas抗原では136番目のSerから305番目のLeuまでの配列が好適に用いられる。また、シグナルペプチド領域を含むアミノ酸配列としては、ヒトFas抗原では-16番目から23番目までの配列、そしてマウスFas抗原では-21番目から14番目までの配列が好適に用いられる。

## 【0019】

本発明で用いられるエフェクター蛋白中の細胞核内受容体としては、グルココルチコイド受容体、プロゲステロン受容体、ミネラルコルチコイド受容体、アンドロジエン受容体、エストロジエン受容体等のステロイド受容体、レチノイドX受容体、レチノイン酸受容体等のレチノイド受容体、ペルオキシソーム増殖葉活性化受容体、ビタミンD<sub>3</sub>受容体、または甲状腺ホルモン受容体が挙げられる。好適には、ヒトまたはラットのエストロジエン受容体、ヒトまたはマウスのレチノイドX受容体 $\alpha$ 、レチノイドX受容体 $\beta$ またはレチノイドX受容体 $\gamma$ あるいは

ヒトまたはマウスのレチノイン酸受容体 $\alpha$ 、レチノイン酸受容体 $\beta$ またはレチノイン酸受容体 $\gamma$ 、ヒトまたはマウスのPPAR $\alpha$ 受容体、ヒトまたはマウスのPPAR $\delta$ 受容体、ヒトまたはマウスのPPAR $\gamma$ 受容体が用いられる。

## 【0020】

それぞれ受容体のリガンド結合領域は既に知られており [Science, 240, 889(1988)、Mol. Endocrinology, 6, 1634(1992)、Biochem. Biophys. Res. Commun., 224, 431(1996)、J. Steroid Biochem. Molec. Biol., 51, 157(1994)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 7355(1994)参照]、例えば、ヒトグルココルチコイド受容体では528番目から777番目まで、ヒトプロゲステロン受容体では680番目から934番目まで、ヒトミネラルコルチコイド受容体では734番目から984番目まで、ヒトアンドロジエン受容体では676番目から919番目まで、ヒトエストロジエン受容体では311番目から551番目まで、ラットエストロジエン受容体では307番目から557番目まで、ヒトレチノイドX受容体 $\alpha$ では225番目から462番目まで、ヒトレチノイドX受容体 $\beta$ では297番目から526番目まで、マウスレチノイドX受容体 $\alpha$ では230番目から467番目まで、マウスレチノイドX受容体 $\beta$ では171番目から410番目まで、マウスレチノイドX受容体 $\gamma$ では229番目から463番目まで、ヒトレチノイン酸受容体 $\alpha$ では198番目から462番目まで、ヒトレチノイン酸受容体 $\beta$ では191番目から448番目まで、ヒトレチノイン酸受容体 $\gamma$ では200番目から454番目まで、マウスレチノイン酸受容体 $\alpha$ では198番目から462番目まで、マウスレチノイン酸受容体 $\beta$ では190番目から448番目まで、マウスレチノイン酸受容体 $\gamma$ では200番目から458番目まで、ヒトビタミンD<sub>3</sub>受容体では192番目から427番目まで、ヒト甲状腺ホルモン受容体 $\alpha$ では183番目から410番目まで、ヒト甲状腺ホルモン受容体 $\beta$ では232番目から456番目まで、ヒトPPAR $\gamma$ (ヒトPPAR $\gamma$ 1サブタイプ)受容体の280番目から478番目まで、マウスPPAR $\gamma$ (マウスPPAR $\gamma$ 1サブタイプ)受容体の280番目から475番目まで、ヒトPPAR $\alpha$ 受容体の273番目から468番目まで、マウスPPAR $\alpha$ 受容体の273番目から468番目まで、ラットPPAR $\alpha$ 受容体の274番目から468番目まで、ヒトPPAR $\delta$ 受

容体の246番目から441番目まで、またはマウスPPAR $\delta$ 受容体の245番目から440番目までのアミノ酸である。

## 【0021】

好適には、ヒトエストロジエン受容体の311番目から551番目まで、ラットエストロジエン受容体の307番目から557番目まで、ヒトレチノイドX受容体 $\alpha$ の225番目から462番目まで、ヒトレチノイドX受容体 $\beta$ の297番目から526番目まで、マウスレチノイドX受容体 $\alpha$ の230番目から467番目まで、マウスレチノイドX受容体 $\beta$ の171番目から410番目まで、マウスレチノイドX受容体 $\gamma$ の229番目から463番目まで、ヒトレチノイン酸受容体 $\alpha$ の198番目から462番目まで、ヒトレチノイン酸受容体 $\beta$ の191番目から448番目まで、ヒトレチノイン酸受容体 $\gamma$ の200番目から454番目まで、マウスレチノイン酸受容体 $\alpha$ の198番目から462番目まで、マウスレチノイン酸受容体 $\beta$ の190番目から448番目まで、マウスレチノイン酸受容体 $\gamma$ の200番目から458番目まで、ヒトPPAR $\gamma$ （ヒトPPAR $\gamma$ 1サブタイプ）受容体の280番目から478番目まで、マウスPPAR $\gamma$ （マウスPPAR $\gamma$ 1サブタイプ）受容体の280番目から475番目まで、ヒトPPAR $\alpha$ 受容体の273番目から468番目まで、マウスPPAR $\alpha$ 受容体の273番目から468番目まで、ラットPPAR $\alpha$ 受容体の274番目から468番目まで、ヒトPPAR $\delta$ 受容体の246番目から441番目まで、またはマウスPPAR $\delta$ 受容体の245番目から440番目までの配列が用いられる。

## 【0022】

より好適には、ヒトエストロジエン受容体の281番目から595番目まで、ラットエストロジエン受容体の286番目から600番目まで、ヒトレチノイン酸受容体 $\alpha$ の176番目から462番目まで、マウスレチノイン酸受容体 $\alpha$ の177番目から458番目まで、ヒトPPAR $\gamma$ （ヒトPPAR $\gamma$ 1サブタイプ）受容体の166番目から478番目まで（ヒトPPAR $\gamma$ 2サブタイプでは194番目から506番目に相当する）、マウスPPAR $\gamma$ （マウスPPAR $\gamma$ 1サブタイプ）受容体の164番目から475番目まで（マウスPPAR $\gamma$ 2サブタイプでは194番目から505番目に相当する）、ヒトPPAR $\alpha$ 受容体の15

6番目から468番目まで、マウスPPAR $\alpha$ 受容体の157番目から468番目まで、ラットPPAR $\alpha$ 受容体の157番目から468番目まで、ヒトPPAR $\delta$ 受容体の129番目から441番目まで、またはマウスPPAR $\delta$ 受容体の128番目から440番目までの配列が用いられる。

【0023】

本発明において用いられる、より好ましいエフェクター蛋白としては、

(i) Gal4蛋白のDNA結合領域の1番目から147番目までのアミノ酸配列のC末端に、ヒトPPAR $\gamma$ 1受容体の176番目のセリン(Ser)から478番目のチロシン(Tyr)までのアミノ酸配列を結合させたエフェクター蛋白、

【0024】

(ii) Gal4蛋白のDNA結合領域の1番目から147番目までのアミノ酸配列のC末端に、マウスPPAR $\gamma$ 1受容体の174番目のセリン(Ser)から475番目のチロシン(Tyr)までのアミノ酸配列を結合させたエフェクター蛋白、

【0025】

(iii) Gal4蛋白のDNA結合領域の1番目から147番目までのアミノ酸配列のC末端に、ヒトPPAR $\gamma$ 2受容体の204番目のセリン(Ser)から506番目のチロシン(Tyr)までのアミノ酸配列を結合させたエフェクター蛋白、

【0026】

(iv) Gal4蛋白のDNA結合領域の1番目から147番目までのアミノ酸配列のC末端に、マウスPPAR $\gamma$ 2受容体の204番目のセリン(Ser)から505番目のチロシン(Tyr)までのアミノ酸配列を結合させたエフェクター蛋白、

【0027】

(v) Gal4蛋白のDNA結合領域の1番目から147番目までのアミノ酸配列のC末端に、ヒトPPAR $\alpha$ 受容体の178番目のセリン(Ser)から467番目のチロシン(Tyr)までのアミノ酸配列を結合させたエフェクター蛋白

## 【0028】

(vi) Gα14蛋白のDNA結合領域の1番目から147番目までのアミノ酸配列のC末端に、マウスPPAR $\alpha$ 受容体の167番目のセリン(Ser)から468番目のチロシン(Tyr)までのアミノ酸配列を結合させたエフェクター蛋白、

## 【0029】

(vii) Gα14蛋白のDNA結合領域の1番目から147番目までのアミノ酸配列のC末端に、ヒトPPAR $\delta$ 受容体の139番目のセリン(Ser)から441番目のチロシン(Tyr)までのアミノ酸配列を結合させたエフェクター蛋白、および

## 【0030】

(viii) Gα14蛋白のDNA結合領域の1番目から147番目までのアミノ酸配列のC末端に、マウスPPAR $\delta$ 受容体の138番目のセリン(Ser)から440番目のチロシン(Tyr)までのアミノ酸配列を結合させたエフェクター蛋白が挙げられる。

## 【0031】

本発明のレポータープラスミド内に繰り返し構造として含まれるGα14蛋白の応答配列であるUASとしては既に知られているものを用いた(Cell, 83, 803(1995)およびCell, 83, 813(1995)参照)。すなわち、5' - CGACGGAG TACTGTCCCTCCGAGCT - 3' の配列を数回、具体的には3回以上、好ましくは4回、より好ましくは5回繰り返した配列である。

## 【0032】

本発明のプロモーターとしてはSV40、HSV、LTR、メタロチオネインプロモーター、チミジンキナーゼ(TK)プロモーターである。好ましくは、TKプロモーターである。より具体的には、プラスミドpTK $\beta$ (クロントック社、Cat. No. 6179-1)に用いられているように(pTK $\beta$ のマップで165番目から945番目までに相当)、転写開始点を1としてTKプロモーターのmRNAの-727番目から56番目までが好ましい。より好ましくはTKプロモータ

ーのmRNAの一〇五番目から51番目までである。

【0033】

本発明には、本発明のレポータープラスミドをコードするDNAも含まれる。よく知られているように、ひとつのアミノ酸をコードするコドンは1～6種類（例えば、メチオニン（Met）は1種類、ロイシン（Leu）は6種類）知られている。従って、アミノ酸配列を変えることなくDNAの塩基配列を変えることができる。

【0034】

本発明には、本発明のレポータープラスミドをコードするDNAのうちFas蛋白ポリペプチドとして同一となるDNA配列全ての塩基配列群が含まれる。塩基配列を変えることによって、融合蛋白の生産性が向上することがある。

本発明のレポータープラスミドをコードするDNAは、以下の方法に従って作製することができる。

【0035】

すなわち、

- (i) Fas抗原と細胞核内受容体のアミノ酸配列のうち、必要とする領域を含むアミノ酸配列をコードするDNAをポリメラーゼチェインリアクション（PCR）法により増幅し、
- (ii) 適当なベクターに、Fas抗原より得られたPCR生成物を組み込み、続いて、細胞核内受容体より得られたPCR生成物を組み込むことにより行なわれる。

【0036】

より詳細に説明すると、

工程(i)は融合に必要な部品をPCR法により増幅する工程である。Fas抗原の場合は、膜貫通領域と機能発現領域を含むアミノ酸配列をコードする塩基配列を化学合成し、プライマーとして用いる。また、細胞核内受容体の場合は、リガンド結合領域を含むアミノ酸配列をコードする塩基配列を化学合成し、プライマーとして用いる。

得られたプライマーの5'末端には特定の制限酵素サイトを設けておく。また

PCR法のテンプレートとしては、相当する哺乳動物、例えば、ヒト、マウス等の細胞または細胞株より単離、精製したmRNAを使用することができる。PCR法は、公知の方法により行なわれる。最近ではPCR自動化装置も普及しているので、該装置が好適に用いられる。

#### 【0037】

工程(ii)は、発現ベクターの中でGal4のDNA結合領域と核内受容体リガンド結合領域に相当するDNAを融合する工程である。本工程に用いられるプラスミドベクターとしては大腸菌内で機能するもの（例えば、pBR322）や枯草菌内で機能するもの（例えば、pUB110）が多数知られているが、いずれであっても好適に用いられる。また、直接発現ベクターに組み込むことも可能である。

#### 【0038】

哺乳動物細胞で発現させる場合、適当なベクター（例えば、レトロウイルスベクター、パピローマウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、SV40系ベクター等）中の適当なプロモーター（例えば、SV40プロモーター、LTRプロモーター、メタロチオネインプロモーター等）の下流に、Gal4のDNA結合領域、次いで細胞核内受容体の当該PCR産物を挿入して発現ベクターを作製する。好適には、pCMX (Cell, 66, 663(1991)に記載されている。) や pSV (Anal. Biochem., 188, 245(1990)に記載されている。) が用いられる。

#### 【0039】

工程(iii)はレポータープラスミドを製造する工程である。本工程に用いられるプラスミドベクターは前述したように大腸菌内で機能するものや枯草菌内で機能するもの、いずれであってもよい。また、直接発現ベクターに組み込むことも可能である。5'上流からGal4応答配列の繰り返し構造、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼプロモーター、Fas構造蛋白をコードするDNAの順にタンデムに配座したDNAを含むプラスミドはその由来が大腸菌で機能するベクターであるか、哺乳動物細胞で機能するベクターであるかによって目的がかなえられる。前述したように、例えばori領域とプロモーター制御因子、そしてひとつまたはそれ以上の選択的マーカー遺伝子を含んでいてもよい。哺乳動物細胞

を用いる場合には、前記の哺乳動物細胞内で機能するプラスミドを用いて適當な哺乳動物細胞を形質転換し、これを適當な培地で培養することによって、これらの細胞が F a s 蛋白発現依存性に死滅する検定細胞となる。

【0040】

哺乳動物細胞で発現させる場合には、所望により F a s 抗原のシグナルペプチド領域をコードする塩基配列の P C R 産物をプロモーターのすぐ下流に挿入することができる。

【0041】

本発明の D N A からなる複製または発現ベクターとしては、例えば、 o r i 領域と、必要により上記 D N A の発現のためのプロモーター、プロモーターの制御因子などからなるプラスミド、ウイルスまたはファージベクターが挙げられる。ベクターはひとつまたはそれ以上の選択的マーカー遺伝子（例えば、ネオマイシン耐性遺伝子、プラスチサイジン S 耐性遺伝子）を含んでいてもよい。

【0042】

また、本発明の蛋白発現系としては、前記の哺乳動物細胞内で機能する発現ベクターで適當な哺乳動物細胞（例えば、サル C O S - 7 細胞、チャイニーズハムスター C H O 細胞、マウス L 細胞、マウス纖維芽細胞、ヒトガン細胞等）を形質転換し、形質転換体を適當な培地で培養することによって、目的とする融合蛋白を生産することができる。以上のようにして得られたポリペプチドは、一般的な生化学的方法によって単離精製することができる。

本発明には、本発明の D N A からなる複製または発現ベクターで形質転換された宿主細胞が含まれる。

【0043】

【発明の効果】

このようにして得られた本発明のプラスミド D N A は、ガンまたは自己免疫疾患治療剤として用いることができる。すなわち、本発明のプラスミド D N A を含む発現ベクターをガン病巣部または自己免疫疾患病巣部にターゲティング法（例えば、リポソーム内に封じ込めて）により局所的に投与する。このベクターは病巣部のガン細胞内に侵入し、遺伝子に入り込む。しかる後に、本発明のエフェク

ター蛋白の一部を構成する細胞核内受容体に対応するリガンド（例えば、該受容体としてレチノイドX受容体を用いた場合には9-cis-レチノイン酸、レチノイン酸受容体を用いた場合にはビタミンA）を投与し、エフェクターを活性化させることによって、Fas蛋白が発現するようになる。ガン細胞内で生産されたFas蛋白によってアポトーシスのシグナルが伝達され、かくしてガン細胞は死滅する。

## 【0044】

さらに、本発明のプラスミドDNAは、細胞核内受容体に対するアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング法として広範に利用することができる。すなわち、本発明に用いられるエフェクター蛋白（Gα14のDNA結合領域下流に種々の核内受容体のリガンド結合領域をコードするDNAを含む発現ベクターDNA）をコードするDNAおよびレポーターDNAを含む発現ベクターを導入している細胞に、検体を添加する。もし細胞が死ねば、検体はアゴニスト活性を有していることを示し、またアゴニスト存在下に細胞が生存すれば、検体はアンタゴニスト活性を有していることが判明する。

## 【0045】

本発明のスクリーニング方法では細胞核内受容体の機能を変化させうるリガンドや化合物の高速評価が可能であり、効果（結果）が細胞死となって表われるのと、その判定が容易であり、操作自体も簡便である。さらに、エフェクター蛋白としてGα14のDNA結合領域下流に種々の核内受容体のリガンド結合領域をコードするDNAを配置することによって、リガンド未知のオーファン受容体を含む核内受容体に作用する化合物の検索ができる一般性のある方法である。もちろん、オーファン核内受容体の生理的リガンドの探索も可能である。具体的には予想されうる生理的リガンド候補や血清の部分分画標品を上記細胞に添加し、細胞死の有無によってリガンドの同定やリガンド活性を担う分画の精製に利用できる。

## 【0046】

また、本発明の方法は個々の値の振れが小さく、実験間の比較ができ、非常に安定している。以上のこととは、特に多検体高速評価において威力を發揮する。さ

らに実際汎用されている自動測定器（ロボット）では必ず吸光度測定器が付属されているので、ロボット対応型の化合物評価系といえる。さらに、この本発明のスクリーニング方法は酵素基質を必要としないため、コストダウンが図れる。

【0047】

【実施例】

以下に、本発明を実施例によって、より詳細かつ具体的に説明するが、もちろんこれによって本発明が制限されるものではない。

【0048】

実施例1：マウスFas抗原のPCR生成物の調製

フクナガ(Fukunaga)らの報告(J. Immunology, 148, 1274(1992)参照)または垣塚(Kakizuka)らの公開特許(特開平7-316200号参照)に従い、マウスFas抗原の構造により以下のプライマーを調製した。

【0049】

F1：131番目から143番目までのアミノ酸配列：ProCysThrAlaThrSerAsnThrAsnCysArgLysGlnの構造に相当し、5'側の一部に制限酵素Hind IIIサイトを導入したセンスプライマー：5'-CCAAGCTTGGCGACCAGCAATACAAACTGCAGGAAAC-3'（配列番号1）を合成した。

【0050】

R1：298番目から306番目(C末端)までのアミノ酸配列：AsnGluAsnGlnGlyGlnCysLeuGluおよび3'非翻訳領域の一部に相当し、さらに3'側の一部にBamHIサイトを導入したアンチセンスプライマー：5'-TCAGGATCCAGACATTGTCCTTCATTTCAT-T-3'（配列番号2）を合成した。

【0051】

マウスT細胞株、RLM-11(Cell, 68, 1109(1992)に記載)より得られたmRNAを鑄型として用い、F1とR1をPCRプライマーとして用いて、サーマルシーケンサー(Perkin Elmer社 GeneAmp PCR System 9600)を使用して、95℃で180秒×1→(95℃で60秒、55℃で60秒、72℃で60秒)

×15→72℃で180秒の条件でRT-PCRを行なった。結果、約520bpの断片（以下、M F a sと記す。）を得、pBluescript（商品名、プロメガ社）マルチクローニングサイトHind III、BamHI制限酵素部位に組み込んだ（以下、pBSMFasと略記する。）。

## 【0052】

実施例2：ヒトPPAR $\alpha$ または $\gamma$ 受容体のPCR生成物の調製

マクハジエ（R. Mukherjee）ら（J. Steroid Biochem. Molec. Biol., 51, 157(1994)参照）、グリーン（M. E. Greene）ら（Gene Expression, 4, 281(1995)参照）またはエルブレヒト（A. Elbrecht）ら（Biochem. Biophys. Res. Commun., 224, 431(1996)参照）に記載されたヒトPPAR $\alpha$ または $\gamma$ の受容体の構造より以下のプライマーを調製した。

## 【0053】

F2：ヒトPPAR $\alpha$ の5'非翻訳領域とN末端アミノ酸Met<sup>1</sup>-Val<sup>2</sup>に相当するセンスプライマー：5'-AACCCAGCACCATCTGGTCGCGATGGT-3'（配列番号3）を合成した。

## 【0054】

R2：ヒトPPAR $\alpha$ の3'非翻訳領域とアミノ酸停止コドンを含むアンチセンスプライマー：5'-AGGTGTGGCTGATCTGAAGGAACCTCA-3'（配列番号4）を合成した。

## 【0055】

F3：ヒトPPAR $\gamma$ （ $\gamma$ 1サブタイプ）の5'非翻訳領域とN末端アミノ酸Met<sup>1</sup>-Ile<sup>2</sup>に相当するセンスプライマー：5'-AGAAATGACCATGGTTGACACAGAGA-3'（配列番号5）を合成した。

## 【0056】

R3：ヒトPPAR $\gamma$ （ $\gamma$ 1サブタイプ）の3'非翻訳領域に相当するアンチセンスプライマー：5'-AAATGTTGGCAGTGGCTCAGGGACTCT-3'（配列番号6）を合成した。

## 【0057】

ギブコBRL（GIBCO BRL）社のスーパースクリプト・ヒューマンリバーコ

N A ライブライリー (Superscript Human Liver cDNA Library, 商品名) , Cat. No. 10422-012) を c D N A ライブライリーとして F 2 と R 2 あるいは F 3 と R 3 を P C R プライマーとして用いて、サーマルシーケンサー (Perkin Elmer社 GeneAmp PCR System 9600) を使用して、95℃で120秒×1→(95℃で60秒、60℃で90秒、72℃で120秒) ×30→72℃で180秒の条件で P C R を行なった、その結果、1450 b p のヒト P P A R  $\alpha$  、1469 b p のヒト P P A R  $\gamma$  を得、ノバゲン (Novagen) 社の T -ベクター (pT7Blue-T vector, Cat. No. 69836-1) に組込み全塩基配列を確認した。

【0058】

実施例3：エフェクター蛋白発現系：G a 1 4 蛋白と核内受容体リガンド結合領域の融合蛋白（G a 1 4 キメラ受容体蛋白）をコードする c D N A を含む発現ベクターの構築

東洋インキ社のピカジーン・ベーシックベクター2 (Pica Gene Basic Vector 2 (登録商標) , P G B V 2, Cat. No. 309-04821) を基本ベクターとして用い、構造遺伝子としてG a 1 4 キメラ受容体蛋白がS V 4 0 プロモーター支配下に発現するベクターを構築した。すなわち、P G B V 2 のルシフェラーゼ構造遺伝子を制限酵素N c o I、X b a Iで切出し、以下のように作製したG a 1 4 キメラ受容体蛋白をコードする c D N A を挿入することで完成した。

【0059】

(1) G a 1 4 転写因子のD N A 結合領域をコードするD N A のと発現ベクターへの組込み

酵母の基本転写因子G a 1 4 蛋白のD N A 結合領域 c D N A を p G B T 9 (クロンテック社、Cat. No. K1605-A) を鑄型としてG a 1 4 の1番目から147番目までのアミノ酸をコードするD N A 断片を実施例2と同反応条件で P C R 増幅した。用いたプライマーは下記F 4 と R 4 である。

【0060】

F 4 : G a 1 4 のD N A 結合領域N末端側1番目から8番目までのアミノ酸および5' 側の一部にH i n d III サイトと哺乳動物細胞内で有効に蛋白発現させる目的でコザック (kozak) 配列を付したセンスプライマー：5' - G C A A G C

TTCACCATGAAGCTACTGTCTTCTATCGAAC-3' (配列番号7) を合成した。

#### 【0061】

R4 : Gal4のDNA結合領域C末端側141番目から147番目までのアミノ酸および5'側の一部にNcoIサイトを付したアンチセンスプライマー: 5'-AGCCATGGCCGGCGATAACAGTCAACTGTCCTTG-3' (配列番号8) を合成し、実施例2と同反応条件でPCR増幅した。その結果、約465bpの増幅DNA断片は全塩基配列を確認し、PGBV2ベクター内のHind III/NcoI部位と組換した（以下、pGVgalと略記する。）。

#### 【0062】

(2) ヒトPPAR $\gamma$ リガンド結合領域をコードするDNA断片の獲得およびGal4-ヒトPPAR $\gamma$ キメラ受容体蛋白発現ベクターの構築

実施例2に従ってヒト肝臓cDNAライブラリーから単離したヒトPPAR $\gamma$ 全長cDNAを鑄型として、ヒトPPAR $\gamma$ リガンド結合領域を含むSer<sup>176</sup> Tyr<sup>478</sup>をコードするDNA断片を下記プライマーを合成し、実施例1と同反応条件でPCR増幅した。

#### 【0063】

F5 : Ser<sup>176</sup>からIle<sup>185</sup>、5'側にNcoIサイト、SV40T抗原由来の核移行シグナル (AlaProLysLysLysArgLysValGly)、およびBamHIサイトを順に並べたセンスプライマー: 5'-GCCATGGCTCTAAGAAGAAGCGTAAGGTAGGATCCCCATAATTGCCATCAGGTTGGGGCGGATC-3' (配列番号9) を合成した。

#### 【0064】

R5 : Glu<sup>472</sup>からTyr<sup>478</sup>、SalIサイトに続いて発現蛋白質の検出用にエピトープタグシーケンスとしてインフルエンザのヘマグルチニンエピトープ (TyrProTyrAspValProAspTyrAla)、翻訳停止コドンおよびXbaIサイトを順に並べたアンチセンスプライマー: 5'-CCTCTAGACTAGCTGGCATAGTCGGGCACGTCGTAGGGGT

AGTCGACGTACAAGTCCTTGAGATCTCC-3' (配列番号10) を合成し、前記した pGVgalのGal4 DNA結合領域をコードするDNA下流のNcoI/ルシフェラーゼ構造遺伝子下流のXbaI部位からルシフェラーゼ構造遺伝子を切出し、ヒトPPAR $\gamma$ リガンド結合領域をコードするDNA断片とを入れ替え、目的とするエフェクター蛋白の発現ベクターを得た(以下、pGVgal/ $\gamma$ LBDと略記する。)。

## 【0065】

(3) ヒトPPAR $\alpha$ リガンド結合領域をコードするDNA断片の獲得およびGal4-ヒトPPAR $\alpha$ キメラ受容体蛋白発現ベクターの構築

ヒトPPAR $\alpha$ リガンド結合領域を含む下記プライマーを合成し、実施例2と同反応条件でPCR增幅し、PPAR $\alpha$ リガンド結合領域構造遺伝子を合成した。このようにして得られたPPAR $\alpha$ リガンド結合領域構造遺伝子を前記で合成したpGVgal/ $\gamma$ LBDベクターの制限酵素サイトのBamHI、SalI部位を両制限酵素の消化によりPPAR $\gamma$ リガンド結合領域構造遺伝子のみを切出したものへ挿入し、Gal4-ヒトPPAR $\alpha$ キメラ受容体蛋白発現ベクターを構築した(以下、pGVgal/ $\alpha$ LBDと略記する。)。

## 【0066】

F6:ヒトPPAR $\alpha$ アミノ酸のSer<sup>167</sup>からArg<sup>175</sup>に相当し、その5'側にBamHIサイトを有するセンスプライマー: 5'-CACGGATCCCCAACACGCGATTCTGTTGGACGA-3' (配列番号11) を合成した。

## 【0067】

R6:ヒトPPAR $\alpha$ アミノ酸のGln<sup>461</sup>からTyr<sup>468</sup>に相当し、その5'側にSalIサイトを有するアンチセンスプライマー: 5'-ATGGTCGACGTACATGTCCCTGTAGATCTCCTG-3' (配列番号12) を合成した。

## 【0068】

実施例4:レポーター遺伝子:Gal4転写因子応答配列下にTKプロモーター、さらにMFA-s構造遺伝子を配したレポータープラスミドの構築

単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ (TK) プロモーター支配下の発現ベクター p TK $\beta$  (クロントック社、Cat. No. 6179-1) を用いた。p TK $\beta$  の $\beta$  ガラクトシダーゼ構造遺伝子上流および下流のNot I サイトを消化し、平滑化した。次に挿入するDNA断片であるMfas 蛋白をコードするDNAをpBS Mfas から Hind III、BamHI の両制限酵素で消化し、切出した後、平滑化した。両DNA断片をライゲートし、TKプロモータ下流にMfas 構造遺伝子が順方向に連結したクローンを選択した。得られた約4400 bp のプラスミド p TK-Mfas は TKプロモーター支配下にMfas 蛋白をコードするDNAを配している。次いでプラスミド p TK-Mfas 内 TKプロモータ上流の Sal I サイトを消化し、平滑化後、マルチクローニングサイトをリンカーDNA (配列番号 13、EcoRI-SalI-KpnI-EcoRV-SacI-NotI) :

5' -GAATTCGTCGACGGTACCGATATCGAGCTCGCGGCCGC-3'

3' -CTTAAGCAGCTGCCATGGCTATAGCTCGAGCGCCGGCG-5'

として挿入し、p TK-Mfas-ML1 (5' -EcoRI-SalI-KpnI-EcoRV-SacI-NotI-3') とした。

#### 【0069】

基本単位を4回繰り返し、両側末端にSal I サイト/Sac I サイトをもち Gal4 応答配列: 5' -T (CGACGGAGTACTGTCCTCCG)<sub>4</sub> AGCT-3' (配列番号 14) を p TK-Mfas-ML1 マルチクローニングサイト内のSal I-Sac I 部位へ挿入することによってエンハンサー領域とした。その結果、4×UAS に続いてTKプロモーター、Mfas 構造遺伝子を配する p 4×UAS-TK-Mfas (約4600 bp) を構築した。

#### 【0070】

得られた発現ベクター p SVgal/ $\alpha$  LBD または p SVgal/ $\gamma$  LBD のいずれかとレポータープラスミドおよび p SV2bsr (科研製薬株式会社、Cat. No. K K-500) を、各々制限酵素Aat II処理による線形化、Not I 処理による線形化、未処理(非線形の状態のまま)の操作後、量比 1 : 1 : 0.1 にて、リポフェクトアミン (LipofectAMINE, GIBCO社, Cat. No. 18324-012) を用いて、マウス

線維芽細胞L929に導入した。Exp. Cell Res., 197, 229(1991)に記載された方法（プラスチサイジンS選択）にて安定導入された細胞を選択した。

## 【0071】

## 実施例5：リガンド応答クローニングの選択

1～2週間の選択後、観測されたコロニーを限界希釀法にてセルクローニングし、増殖させた。例えば、各サブクローニング  $2 \times 10^4$  個／ $100\mu l$  の割合で10%牛胎児血清（FCS）を含む最少イーグル培地（Earle's MEM）に浮遊させ、96穴マイクロタイタープレートに分配し、5%炭酸ガス中で37℃で4～6時間培養した。PPARγリガンドとして知られているCS-045およびBRL-49653（Cell, 83, 863(1995)、Endocrinology, 137, 4189(1996)およびJ. Med. Chem., 39, 665(1996)参照）、PPARαリガンドとして知られているカルバサイクリンおよびETYA（J. Steroid Biochem. Molec., 51, 157(1994)、e 11 Structure and Function, 18, 267(1993)、Gene & Development, 10, 974(1996)およびEur. J. Biochem., 233, 242(1996)参照）を用いてリガンド添加条件で有意に死滅する細胞を選択した。すなわち、これらの化合物の最終濃度 $10\mu M$ の2倍濃度の試料 $100\mu l$ を同培養ウェル中に添加し、さらに40時間培養した。上清を捨てた後に、クリスタルバイオレット液（0.75%クリスタルバイオレット-0.25%NaCl-1.75%ホルムアルデヒドの50%エタノール液）に、室温で20分間浸し、ホスフェートバッファーセーライン（PBS）によるプレート洗浄を2回繰返して生存細胞を染色した（Cell, 66, 233(1991)参照）。プレートは直接マイクロプレートリーダーで570nmの吸光度を測定した。

## 【0072】

## 実施例6：PPARγおよびαリガンドのプラスミド安定導入L929細胞を用いた殺細胞アッセイ

実施例5で得られた最も応答能の高いクローニングを上記の方法で培養し、この培養細胞を用いて、上記の化合物を上記の方法で細胞死を起こさせ、生残細胞を染色し、吸光度を測定した。細胞死は24時間後から有意に出現し、36～40時間ではプラトードに到達して完結した。

CS-045およびBRL-49653でPPARγリガンド応答クローニングを40

時間処理した時の生細胞数の用量依存的な変化を図1（A）に示し、同様にコントロール細胞（L929）を化合物処理した時の生細胞数の用量依存的な変化図1（B）を示す。また、カルバサイクリンおよびWy-14643でPPAR $\gamma$ リガンド応答クローニングを40時間処理した時の生細胞数の用量依存的な変化を図2（A）に示し、同様にコントロール細胞（L929）を化合物処理した時の生細胞数の用量依存的な変化を図2（B）に示す。さらに、カルバサイクリン、ETYA、Wy-14643およびCS-045でPPAR $\alpha$ リガンド応答クローニングを40時間処理した時の生細胞数の用量依存的な変化を図3（A）に示し、同様にコントロール細胞（L929）を化合物処理した時の生細胞数の用量依存的な変化図3（B）を示す。なお、各図とも、溶媒のみを添加し、化合物を添加しない時の生細胞数の割合を100%として表示している。

#### 【0073】

図1から明らかなように、エフェクター蛋白Gα14-ヒトPPAR $\gamma$ キメラ受容体蛋白の発現ベクターを安定導入した細胞ではPPAR $\gamma$ アゴニストとして知られているCS-045およびBRL-49653はL929細胞に対し、直接的な毒性を示さないが、応答細胞を有意に死滅させ、しかも用量依存的な細胞死を示した。しかも、同じPPAR $\gamma$ アゴニストであってもPPAR $\gamma$ 蛋白との結合親和性が高い、あるいは転写活性化能の大きな化合物（Biochem. Biophys. Res. Commun., 224, 431(1996)参照）ほど低濃度から著明な殺細胞作用を示した。

#### 【0074】

図2から明らかなように、PPAR $\alpha$ アゴニストとして知られているカルバサイクリンやPPAR $\alpha$ 受容体アゴニストとして知られているWy-14643に対しては毒性を示さない各々10 $\mu$ M、100 $\mu$ M以下の濃度では細胞死を示さない。特に、カルバサイクリンがPPAR $\gamma$ アゴニスト活性を示さない10 $\mu$ M以下の濃度（Genes & Development, 10, 974(1996)参照）では、このPPAR $\gamma$ リガンド応答細胞では全く細胞死を示さない。

#### 【0075】

図3から明らかなように、PPAR $\alpha$ アゴニストとして知られているカルバサイクリン、ETYAおよびWy-14643に対しては用量依存的な細胞死を示す。

一方、PPAR $\gamma$ アゴニストとして知られているCS-045に対しては毒性を示さない10 $\mu$ M以下の濃度では細胞死を示さない。しかも、同じPPAR $\alpha$ アゴニストであってもPPAR $\alpha$ 蛋白との結合親和性が高い、あるいは転写活性化能の大きな化合物ほど低濃度から著明な殺細胞作用を示した。

【0076】

以上の図1、図2および図3の結果から、機能的なMfasペプチドの過発現によって細胞死がメディエートされること、PPAR $\gamma$ リガンド応答細胞はPPAR $\gamma$ リガンドの作用強度に、一方、PPAR $\alpha$ リガンド応答細胞はPPAR $\alpha$ リガンドの作用強度によく相関して細胞死を起こすことが判明した。さらに、PPARのみならず他の核内受容体においても、またヒトのみならず別の動物種由来のPPARであっても細胞死は生じた。本発明のレポーター・アッセイで評価される核内受容体リガンドはプラスミドを安定導入したリガンド高応答クローニングによって、その核内受容体に特異的なリガンドが簡便に評価できる特異な方法である。しかもレポーター・アッセイで評価しうる被験化合物の作用量は本発明のシステムにおける殺細胞作用を示す濃度域と極めて一致しており、各リガンドの作用強度も併せて評価することができる優れた方法である。

【0077】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：35

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

CCAAGCTTGG CGACCCAGCAA TACAAACTGCAG GAAAC

【0078】

配列番号：2

配列の長さ：32

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

TCAGGATCCA GACATTGTCC TTCATTTCA TT

【0079】

配列番号：3

配列の長さ：26

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

AACCAGCACC ATCTGGTCGC GATGGT

【0080】

配列番号：4

配列の長さ：26

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

AGGTGTGGCT GATCTGAAGG AACTCA

【0081】

配列番号：5

配列の長さ：26

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列AGAAATGACC ATGGTTGACA CAGAGA

【0082】

配列番号：6

配列の長さ：26

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

AAATGTTGGC AGTGGCTCAG GACTCT

【0083】

配列番号：7

配列の長さ：37

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

GCAAGCTTCA CCATGAAGCT ACTGTCTTCT ATCGAAC

【0084】

配列番号：8

配列の長さ：33

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

AGCCATGGCC GCGATACAG TCAACTGTCT TTG

【0085】

配列番号：9

配列の長さ：63

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

GCCATGGCTC CTAAGAAGAA GCGTAAGGTA GGATCCCATA ATGCCATCAG GTTTGGCGGG 60

ATC 63

【0086】

配列番号：10

配列の長さ：69

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

CCTCTAGACT AGCTGGCATA GTCGGGCACG TCGTAGGGGT AGTCGACGTA CAAGTCCTTG 60

TAGATCTCC 69

【0087】

配列番号：11

配列の長さ：33

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

CACGGATCCC ACAACGCGAT TCGTTTGGA CGA

【0088】

配列番号：12

配列の長さ：31

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

ATGGTCGACG TACATGTCCCTG TAGATCTCCT G

【0089】

配列番号：13

配列の長さ：38

配列の型：核酸

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

GAATTCTCG ACGGTACCGA TATCGAGCTC GCGGCCGC

CTTAAGCAGC TGCCATGGCT ATAGCTCGAG CGCCGGCG

【0090】

配列番号：14

配列の長さ：85

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

TCGACGGAGT ACTGT CCTCC GCGACGGAGT ACTGT CCTCC GCGACGGAGT ACTGT CCTCC 60

GCGACGGAGT ACTGT CCTCC GAGCT 85

【図面の簡単な説明】

【図1】 PPAR $\gamma$ リガンド応答性のL929細胞を用いた殺細胞アッセイを行ない各化合物を処理後の生細胞数の用量依存的な変化を示すグラフであり、(A)はPPAR $\gamma$ リガンド応答細胞の場合を示し、(B)は正常細胞の場合を示す。

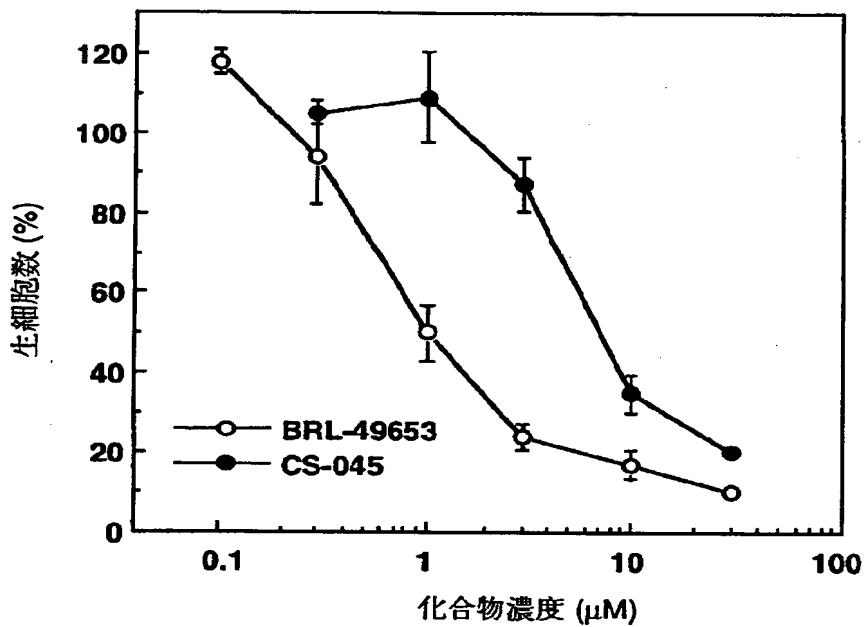
【図2】 PPAR $\gamma$ リガンド応答性のL929細胞を用いた殺細胞アッセイを行ない各化合物を処理後の生細胞数の用量依存的な変化を示すグラフであり、(A)はPPAR $\gamma$ リガンド応答細胞の場合を示し、(B)は正常細胞の場合を示す。

【図3】 PPAR $\alpha$ リガンド応答性のL929細胞を用いた殺細胞アッセイを行ない各化合物を処理後の生細胞数の用量依存的な変化を示すグラフであり、(A)はPPAR $\alpha$ リガンド応答細胞の場合を示し、(B)は正常細胞の場合を示す。

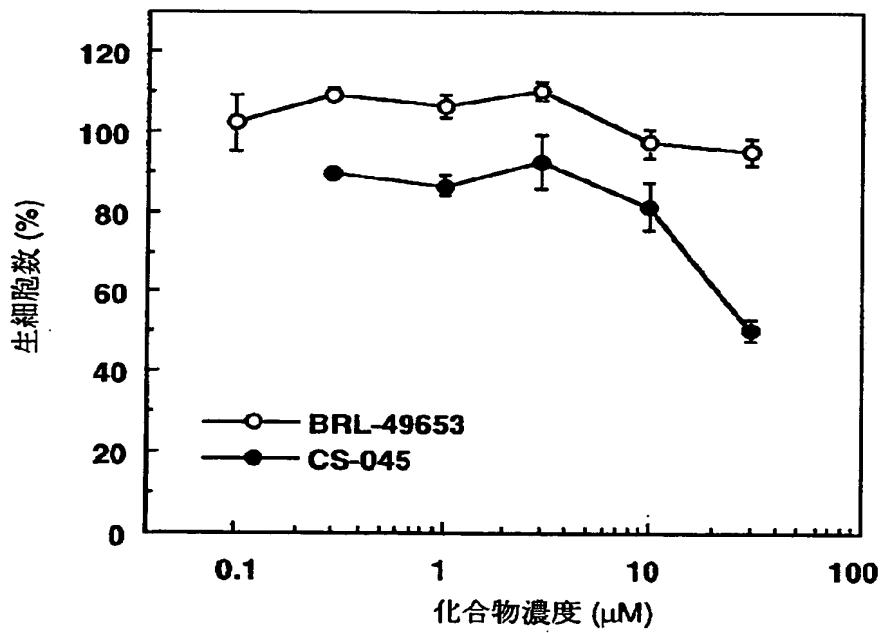
【書類名】 図面

【図1】

( A )

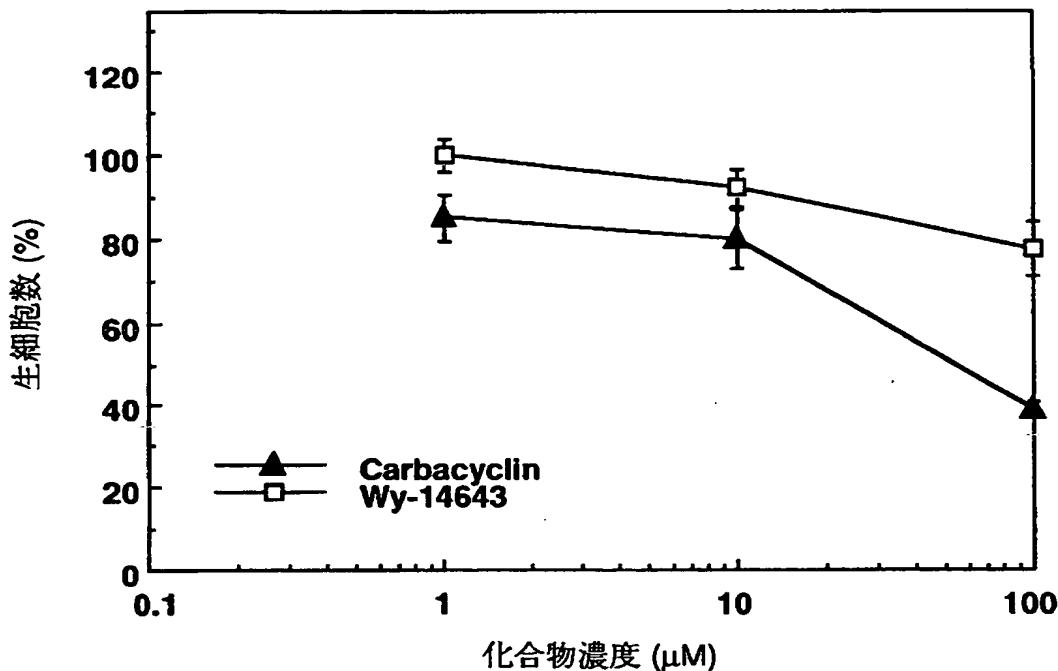


( B )

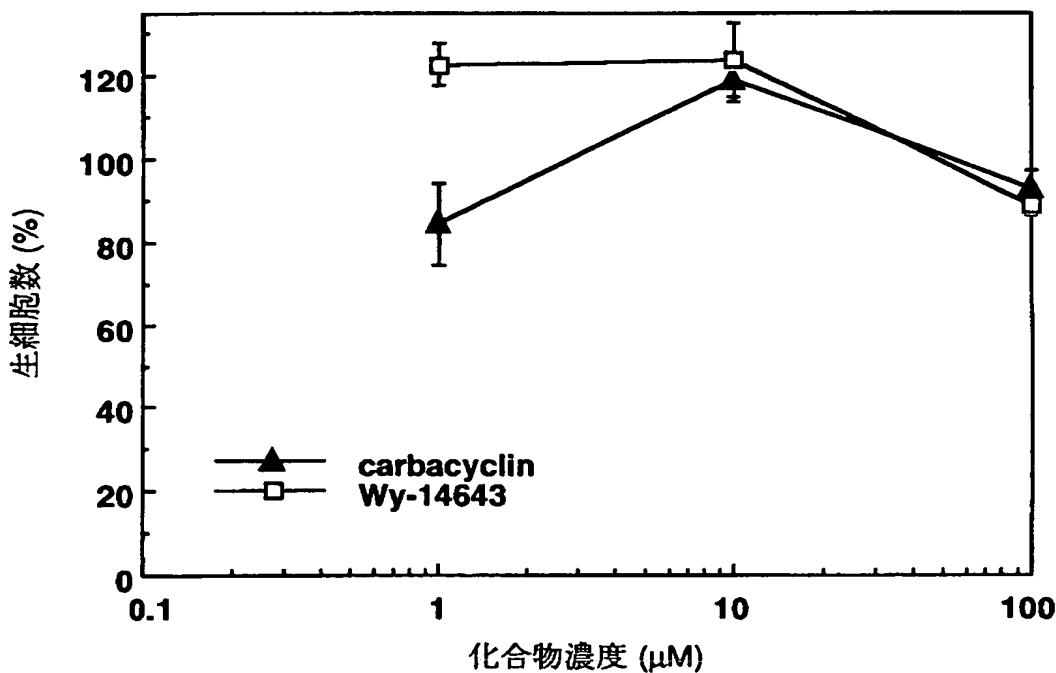


【図2】

(A)

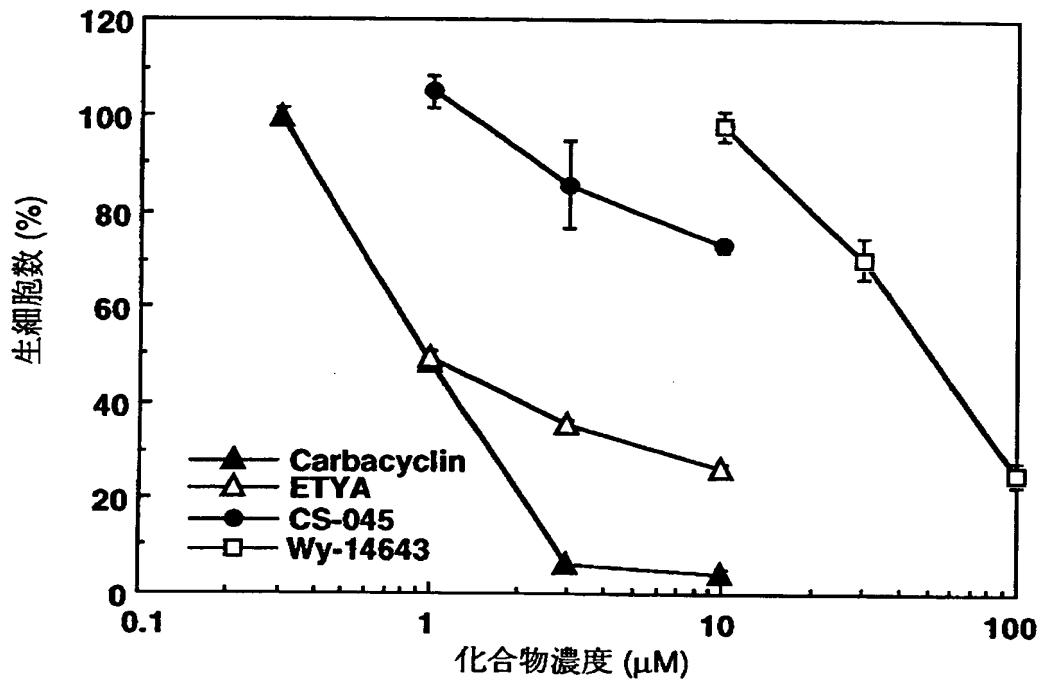


(B)

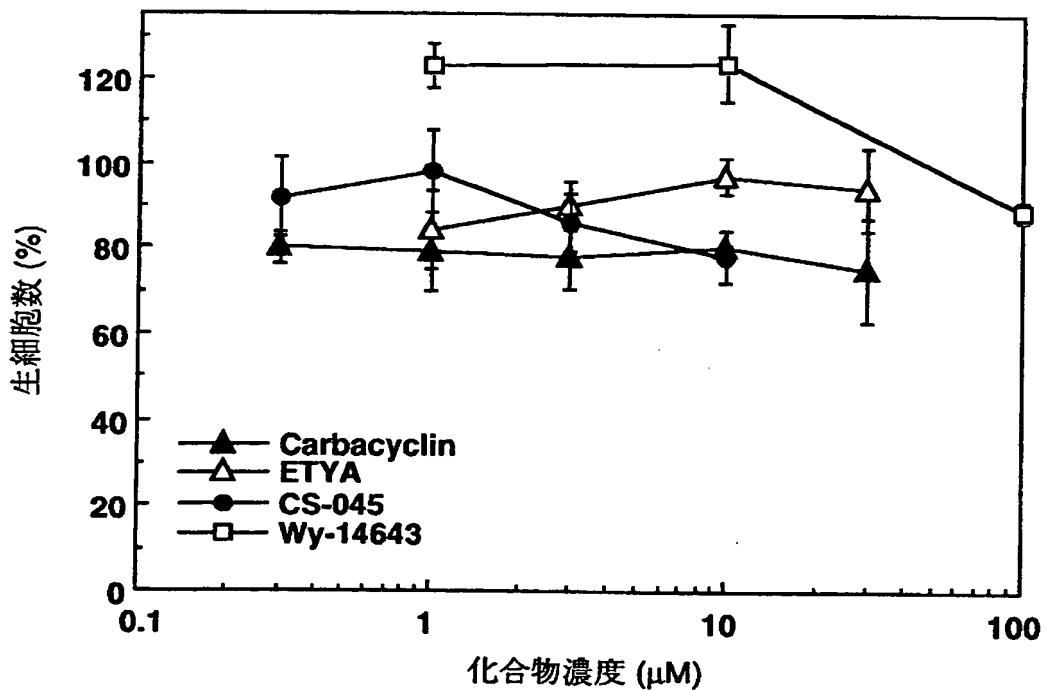


【図3】

( A )



( B )



【書類名】 要約書

【要約】

【構成】 (i) 新規なレポーター遺伝子DNAを含むプラスミドDNA、(ii) 前記プラスミドDNAと公知のエフェクター蛋白をコードするDNAで形質転換された形質転換体、(iii) 前記両DNAを有効成分として含有するガンまたは自己免疫疾患の治療剤、および(iv) 前記形質転換体を用いる細胞核内受容体のリガンドの検出方法。

【効果】 本発明のレポーター遺伝子DNAを含むプラスミドDNAと公知のエフェクター蛋白をコードするDNAで形質転換された形質転換体は細胞核内受容体に対するリガンドが結合することによって、Fas抗原の機能（アポトーシス）が発現され、ガン治療剤または自己免疫疾患の治療剤、および細胞核内受容体のリガンドの検出方法として利用される。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ  
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 000185983  
【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区道修町2丁目1番5号  
【氏名又は名称】 小野薬品工業株式会社  
【代理人】 申請人  
【識別番号】 100081086  
【住所又は居所】 東京都中央区日本橋人形町2丁目2番6号 堀口第  
2ビル7階 大家特許事務所  
【氏名又は名称】 大家 邦久  
【代理人】  
【識別番号】 100088719  
【住所又は居所】 東京都中央区日本橋人形町2丁目2番6号 堀口第  
2ビル7階 大家特許事務所  
【氏名又は名称】 千葉 博史

出願人履歴情報

識別番号 [000185983]

1. 変更年月日 1990年 9月 2日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府大阪市中央区道修町2丁目1番5号  
氏 名 小野薬品工業株式会社

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**